



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 9603405-0 A**

(22) Data de Depósito: 13/08/1996

(43) Data de Publicação: 25/08/98 (RPI 1444)

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>.:  
C08B 37/08  
A61K 35/56  
A61K 31/725

(54) Título: **AÇÃO ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICA DE UM CONDOITIM SULFATO FUCOSILADO EXTRAÍDO DO PEPINO DO MAR**

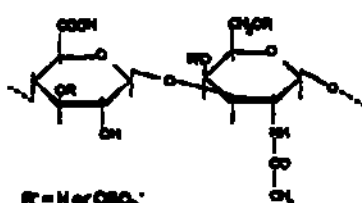
(71) Depositante(s): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BR/RJ)

(72) Inventor(es): Paulo Antonio de Souza Mourão

(74) Procurador: Níza Xavier Kover

(57) Resumo: Patente de Invenção. "AÇÃO ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICA DE UM CONDOITIM SULFATO FUCOSILADO EXTRAÍDO DO PEPINO DO MAR" A presente invenção se refere a descoberta de um "condroitin sulfato fucosilado" extraído do pepino do mar. Este polissacarídeo tem elevada atividade anticoagulante e antitrombótica, podendo ser utilizado na prevenção ou reversão da trombose arterial.

Porção próxima ao terminal não redutor



R' = H or OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>

R =

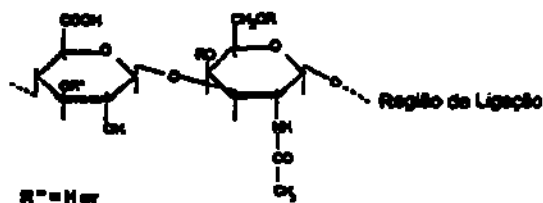


-49%: R<sub>1</sub> = OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>; R<sub>2</sub> = OH; R<sub>3</sub> = OH

-30%: R<sub>1</sub> = OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>; R<sub>2</sub> = OH; R<sub>3</sub> = OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>

-17%: R<sub>1</sub> = OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>; R<sub>2</sub> = OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>; R<sub>3</sub> = OH

Porção próxima ao terminal redutor



R' = H or



Unidades dissacáridicas  
de fucosil-fucosil

4-O-sulfatação?

**Relatório Descritivo da Patente de Invenção: 'AÇÃO ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICA DE UM CONDRITIM SULFATO FUCOSILADO EXTRAÍDO DO PEPINO DO MAR'.**

A presente invenção se refere a descoberta de um polissacarídeo sulfatado com potente ação anticoagulante e antitrombótica, sugerindo sua  
5 possível utilização na terapia e profilaxia da trombose arterial e venosa.

*Importância da descoberta de novos polissacarídeos sulfatados com ação anticoagulante e antitrombótica:* A heparina é um polissacarídeo constituído de unidades alternadas de ácido glucurônico e glucosamina, com  
10 alto conteúdo de esteres sulfato. Atualmente é o principal composto utilizado no tratamento e profilaxia da trombose venosa (Kakkar e Hedges, em: *Heparina*, pp. 455-473, 1989, Edward Arnold, Londres). O mecanismo de ação anticoagulante da heparina deve-se principalmente a sua interação com a antitrombina e com o cofator II da heparina, formando complexos  
15 muito mais potentes na inibição da trombina e do fator Xa. Porém, este polissacarídeo é menos efetivo na inibição da trombina e do fator Xa já previamente liberados, e situados dentro do coágulo. O tamanho e a conformação estrutural do complexo heparina/antitrombina dificulta o seu acesso à trombina ativa ou ao fator Xa dentro da rede de fibrina. A heparina  
20 tem como principal complicação clínica o sangramento por distúrbio da coagulação e/ou trombocitopenia. Além disso, por ser extraída de tecidos de

mamíferos (principalmente pulmão bovino e intestino de porco) pode acarretar problemas de contaminação viral.

Recentemente novos agentes antitrombóticos vem sendo descritos como alternativa à heparina. Entre estes compostos destaca-se o dermatam sulfato, um polissacarídeo cuja estrutura é semelhante a da heparina, porém com menor ação anticoagulante. Portanto, altas doses calculadas em mg/kg de peso corporal são necessárias para o aparecimento do efeito antitrombótico *in vivo*, podendo causar dor e hematoma no local de sua aplicação. O dermatam sulfato também é extraído de tecidos de mamíferos podendo causar os mesmos problemas de contaminação com vírus já citados para a heparina.

Outros tipos de polissacarídeos sulfatados, não obtidos de mamíferos, também possuem ações anticoagulante e antitrombótica. Por exemplo, fucanas sulfatadas extraídas de algas marinhas e pentosam polisulfato ou dexam sulfato, ambos obtidos por sulfatação química de polissacarídeos naturais, vem sendo estudados há muitos anos. Entretanto, as ações anticoagulantes e antitrombóticas destes polissacarídeos estão associadas com o aumento do tempo de sangramento, impossibilitando sua utilização clínica.

*Isolamento e caracterização estrutural de um condroitim sulfato fucosilado do pepino do mar:* O estudo dos polissacarídeos sulfatados (principalmente glicosaminoglicanos) desenvolvidos em nosso laboratório estendeu-se, nos últimos anos, à análise de tecidos de invertebrados. Nesta nova linha de investigação encontramos altas concentrações de polissacarídeos sulfatados nos tecidos de invertebrados. Estes polissacarídeos são distintos dos glicosaminoglicanos, das carragenanas, das fucanas sulfatadas e de todos os outros polissacarídeos sulfatados

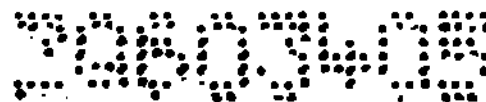
anteriormente descritos na literatura. Em especial, na parede do corpo do pepino do mar (Equinodermata) encontramos um polissacarídeo sulfatado rico em fucose, ácido glucurônico e galactosamina. Utilizando métodos químicos, enzimáticos e espectrofotométricos foi possível caracterizar sua estrutura, como mostra a Figura 1. Este novo composto foi denominado "condroitim sulfato fucosilado".

*Método para extração e purificação do condroitim sulfato fucosilado:*

O pepino do mar é um invertebrado marinho que pode ser obtido com facilidade e em grande quantidade. Em geral aparece na rede dos pescadores, sem nenhuma aplicação comercial, exceto como comestível em restaurantes orientais. Portanto, sua utilização na extensão proposta nesta Patente não apresenta risco ao meio ambiente ou de diminuição significativa da espécie. O "condroitim sulfato fucosilado" ocorre em alta concentração nos tecidos do pepino do mar do Brasil (10 - 20% do peso seco). O método descrito abaixo permite sua extração e purificação com facilidade:

Coletar espécies do pepino do mar *Ludwigothuea grisea* e mergulhar em ~5 volumes de acetona comercial, mantendo esta solução na temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, remover a acetona, secar o tecido em estufa a 60°C, e tritura-lo em pequenos pedaços. Dissolver o material seco (60 g) em 1,8 litros de tampão acetato de sódio 0.1 M, contendo EDTA 0,05 M e cisteína 0,05 M. Adicionar 5 g de papaina bruta e manter a mistura a 60°C por 12 horas, sob discreta agitação. Colher o sobrenadante e adicionar 60 ml de uma solução de cloreto de cetil-piridina a 10%, mantendo a mistura em repouso por 24 horas na temperatura ambiente. No precipitado temos o polissacarídeo sulfatado complexado com a amônia quaternária cetil-piridina. O complexo é dissociado pela adição de 1,3 litros de uma solução de NaCl 2,0 M: etanol absoluto (100:15, v/v),





mantendo a mistura sob agitação por ~1 hora. Ao sobrenadante adicionar 2 volumes de etanol comercial, mantendo a 4°C por 24 horas. O precipitado é separado por centrifugação ou decantação, seco numa estufa a 60°C, contendo então o "condroitim sulfato fucosilado".

5 Este composto pode ser submetido a uma purificação adicional, principalmente visando sua utilização *in vivo*. O procedimento envolve a utilização de resina de troca iônica DEAE-celulose. Este procedimento envolve o preparo de uma solução concentrada do polissacarídeo sulfatado (~20 mg/ml) em tampão acetato de sódio 0,05 M contendo 0,05 M EDTA. Em  
10 seguida, adicionar resina de DEAE-celulose, sob agitação, até a total complexação do polissacarídeo sulfatado com a resina. Isto pode ser facilmente medido pelo desaparecimento da metacromasia da solução, medida com uma solução do corante azul de dimetilmetileno (*Biochim. Biophys. Acta* 883:173-177,1986). A resina é inicialmente lavada com 3  
15 volumes de uma solução de NaCl 0,5 M, contendo EDTA 0,05 M. Em seguida, o "condroitim sulfato fucosilado" é removido da resina pela lavagem com uma solução de NaCl 1,0 M, contendo EDTA 0,05 M. A resina deve ser lavada com esta solução até o desaparecimento da metacromasia, monitorada pela azul de dimetilmetileno (ver acima). O "condroitim sulfato  
20 fucosilado" neste eluato é precipitado com 3 volumes de etanol comercial a 4°C por 24 horas, o precipitado é obtido por decantação ou centrifugação, seco numa estufa a 60°C, contendo o "condroitim sulfato fucosilado" purificado.

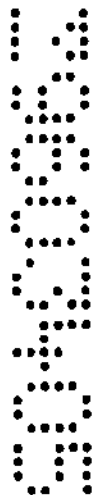
O "condroitim sulfato fucosilado" purificado possui a seguinte  
25 composição química: ácido glucurônico:galactosamina:fucose na razão molar 1,00:0,92:1,23. Seu conteúdo de sulfato é de 0,7 moles de sulfato por açúcar total (soma do conteúdo de ácido glucurônico + galactosamina + fucose).

*Elevada ação anticoagulante do condroitim sulfato fucosilado:* A ação anticoagulante do "condroitim sulfato fucosilado" foi medida pelo teste do APTT (Activated Partial Thromboplastin Time) (*Thromb. Res.* 34:319-328,1981 e 28:343-350,1982). Este é o método mais amplamente utilizado para a medida da atividade anticoagulante de uma substância.

Os resultados indicam que o "condroitim sulfato fucosilado" tem alta ação anticoagulante (a na Tabela 1). Este valor é comparável àquele da heparina de baixo peso molecular, que é o composto atualmente mais empregado na terapia antitrombótica na Europa e E.U.A. Esta alta ação anticoagulante não é uma característica inespecífica de polímeros contendo fucose sulfatada, já que uma fucana sulfatada extraída do pepino do mar, apesar de altamente sulfatada (*J. Biol. Chem.* 269:22113-22123,1994) possui baixa ação anticoagulante (b na Tabela 1).

A redução das carboxilas do "condroitim sulfato fucosilado" não altera sua ação anticoagulante, porém a remoção das ramificações de fucose sulfatada ou dos esteres de sulfato elimina sua atividade biológica (Tabela 1). Estes resultados indicam que as ramificações de fucose sulfatada (Fig. 1) são responsáveis pela alta ação anticoagulante deste polissacarídeo do pepino do mar.

O mecanismo da ação anticoagulante do "condroitim sulfato fucosilado" foi determinado utilizando proteínas plasmáticas purificadas e substrato cromogênico (*Thromb. Res.* 8:859-867,1976 e 35:257-266,1984). Nossos resultados indicam que o "condroitim sulfato fucosilado" potencializa a inibição da trombina produzida pela antitrombina e pelo cofactor II da heparina. A curva de inibição da trombina pelo cofator II da heparina versus concentração do polissacarídeo indica que o "condroitim sulfato fucosilado" age na mesma faixa de concentração da heparina e do dermatam sulfato.



Entretanto, o IC<sub>50</sub> para a inibição da trombina pelo "condroitim sulfato fucosilado" na presença de antitrombina é aproximadamente 10 vezes maior do que o IC<sub>50</sub> da heparina (Figura 2). Em síntese, o "condroitim sulfato fucosilado" isolado do pepino do mar tem alta ação anticoagulante devido a sua capacidade de potencializar a inibição da trombina pelo cofator II da heparina e pela antitrombina. Estes resultados indicam uma diferença entre esta preparação de polissacarídeo sulfatado do pepino do mar e aquela descrita na Patente WO 90/08784 (09.08.90 90/19), já que neste último caso a ação anticoagulante do polissacarídeo não é mediada pela trombina ou pelo fator Xa.

**Ação antitrombótica do condroitim sulfato fucosilado:** A ação antitrombótica do "condroitim sulfato fucosilado" foi testada em coelhos utilizando o modelo descrito por Wessler (*Circulation* 12:553-556, 1955). Este modelo reproduz uma condição experimental semelhante àquela observada na clínica, ou seja em pacientes com risco de trombose e é o modelo animal mais amplamente utilizado na avaliação experimental de drogas antitrombóticas (Hladovec, Em: *Antithrombotic drugs in thrombosis models*, pp 39-74, 1989, CRC Press, Florida, EUA).

Nossos resultados indicam que o "condroitim sulfato fucosilado" tem ação antitrombótica. O efeito é dose dependente (Fig. 3A) e acompanhado por alteração *in vivo* do APTT (Fig. 3B). A remoção das ramificações de fucose sulfatada elimina a ação antitrombótica enquanto a carboxi-redução não altera este efeito. Portanto, há um paralelismo entre a ação anticoagulante *in vitro* e o efeito antitrombótico *in vivo*.

O "condroitim sulfato fucosilado" é um agente antitrombótico mais potente do que o dermatam sulfato de mamífero e as fucanas sulfatadas de algas marinhas (Tabela 2). Embora menos potente do que a heparina não

fracionada, a dose de "condroitim sulfato fucosilado" necessário para a  
abolição total da trombose no modelo de Wessler é semelhante àquela de  
algumas preparações de heparina de baixo peso molecular.

Outra observação significativa é que o "condroitim sulfato fucosilado"  
5 não apresenta alteração significativa no tempo de sangramento quando  
testado no modelo de cauda de rato mergulhada numa solução de  
polissacarídeo em concentrações até 1,0 mg/ml. Tanto a heparina, quanto  
dextram sulfato e pentosam polisulfato mostram alterações significativas no  
tempo de sangramento quando testados neste modelo e nesta faixa de  
10 concentração.

*O condroitim sulfato fucosilado não apresenta indicações de efeito  
tóxico:* O "condroitim sulfato fucosilado" foi administrado em dose de 20  
mg/dia por via intraperitoneal em ratos por um período de 30 dias. Nenhum  
efeito tóxico foi observado. Os ratos não apresentaram sangramento, óbito,  
15 ou qualquer outra indicação de alterações patológicas. Estes resultados  
indicam uma diferença marcante entre o polissacarídeo sulfatado aqui  
descrito e aquele relatado em outra Patente (WO 90/08784 - 09.08.90  
90/19). Neste último caso o polissacarídeo não degradado quimicamente  
apresenta um elevado efeito tóxico quando administrado em ratos,  
20 provavelmente devido ao seu efeito agregador de plaquetas.

Outra observação significativa é que ao ser administrado ao rato em  
doses elevadas (~30 mg) por via endovenosa não observamos alteração  
significativa da pressão arterial, como relatado por exemplo para o dextram  
sulfato de alto peso molecular.

25 **Legenda da Figura 1:**

A Figura 1 apresenta a estrutura proposta para o "condroitim sulfato  
fucosilado" extraído do pepino do mar. Esta estrutura foi determinada por

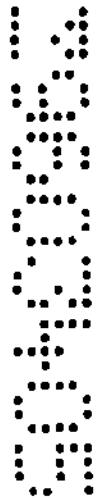




uma combinação de métodos químicos, enzimáticos e espectrofotométricos. O polissacarídeo é constituído por uma cadeia central contendo unidades alternadas de ácido  $\beta$ -D-glucurônico e *N*-acetyl  $\beta$ -D-galactosamina. A posição 3 do ácido glucurônico está substituída com ramificações de fucose sulfatada. Na porção do polissacarídeo próxima do terminal não redutor as ramificações são constituídas de fucose mono ou disulfatadas. Na porção próxima ao terminal redutor da molécula as ramificações de fucose tem estrutura mais heterogenea. Provavelmente há unidades de fucose não-sulfatada e/ou unidades dissacarídicas de fucosil-fucosil. Não foi possível determinar o padrão de sulfatação das ramificações de fucose na porção próxima ao terminal redutor. As unidades de fucose mono e disulfatadas no porção próxima ao terminal não redutor da molécula são mais sensíveis à hidrólise ácida branda e podem ser facilmente removidas por este tratamento químico.

#### 15      **Legenda da Figura 2:**

A Figura mostra a inibição da trombina na presença de antitrombina (A) ou do cofator II da heparina (B) em função da concentração de polissacarídeo sulfatado. A metodologia utilizada neste experimento é descrita na publicação: *Tromb. Res.* 8:859-867, 1976 e 35:257-266, 1984. Os polissacarídeos utilizados são: "condroitim sulfato fucosilado" antes (*fucCS*) e após as seguintes modificações químicas: carboxi-redução (*CR*), desulfatação (*deSO<sub>4</sub>*) e defucosilação (*de fuc*); dermatam sulfato (*DS*) e heparina (*Hep*). Observe que o  $IC_{50}$  para o "condroitim sulfato fucosilado" é aproximadamente 10 vezes mais elevado do que o  $IC_{50}$  para a heparina quando a incubação é realizada na presença de antitrombina (A). Porém, o  $IC_{50}$  para os dois polissacarídeos é muito semelhante quando a incubação é feita na presença do cofator II da heparina (B).



**Legenda da Figura 3:**

A Figura 3 mostra o efeito antitrombótico do "condroitim sulfato fucosilado" (A) e a alteração do APTT durante a injeção endovenosa deste polissacarídeo (B). O efeito antitrombótico foi medido em coelhos adultos  
5 utilizando o método de Wessler (*Circulation* 12:553-556, 1955).



**Tabela 1:** Ação anticoagulante do condroitim sulfato fucosilado em comparação com glicosaminoglicanos de vertebrados e fucanas sulfatadas

Origem	Polissacarídeo	Modificação química	APTT (unidades internacionais/mg) <sup>a</sup>
Invertebrados	a-) Condroitim sulfato fucosilado do pepino do mar	Nativo	40
		Defucosilado	<1
		Desulfatado	<1
		Carboxi-reduzido	39
	b-) Fucana sulfatada do ouriço do mar		8
Vertebrados	c-) Dermatom sulfato de mucosa bovina		4
	d-) Condroitim 6-sulfato de tubarão		<1
	e-) Heparina não fracionada <sup>b</sup>		193
	f-) Heparina de baixo peso molecular <sup>b</sup>		30

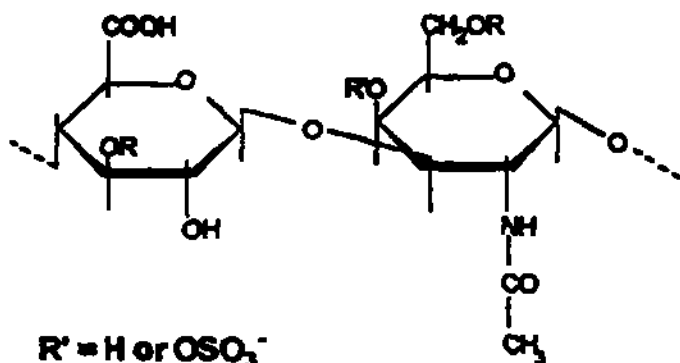
<sup>a</sup>A atividade é expressa como unidade internacional/mg utilizando uma curva padrão com o padrão internacional de heparina (193 unidades/mg).

<sup>b</sup>Padrões internacionais.

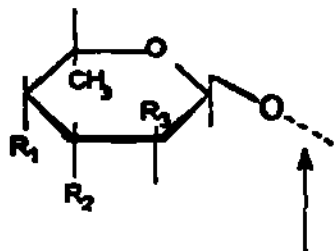
**Tabela 2:** Dose de polissacarídeo para produzir inibição total da trombose venosa em coelhos adultos utilizando o modelo de Wessler

Polissacarídeo	Dose (mg/kg)	Efeito sobre o tempo de sangramento	Referência
Condroitin sulfato fucosilado	1,5	Baixo	Nossos resultados
Dermatam sulfato	2,5	Baixo	<i>Thromb. Haemost.</i> 64:290-293,1990
Fucana sulfatada	3,2	Baixo	<i>Thromb. Haemost.</i> 74:1280-1285,1995
Heparina não fracionada	0.15	Alto	<i>Thromb. Haemost.</i> 64:290-293,1990
Heparina de baixo peso molecular	0.50	Alto	<i>Thromb. Haemost.</i> 61:204,1989

Porção próxima ao terminal não redutor



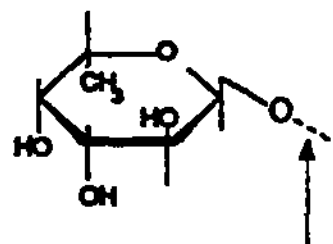
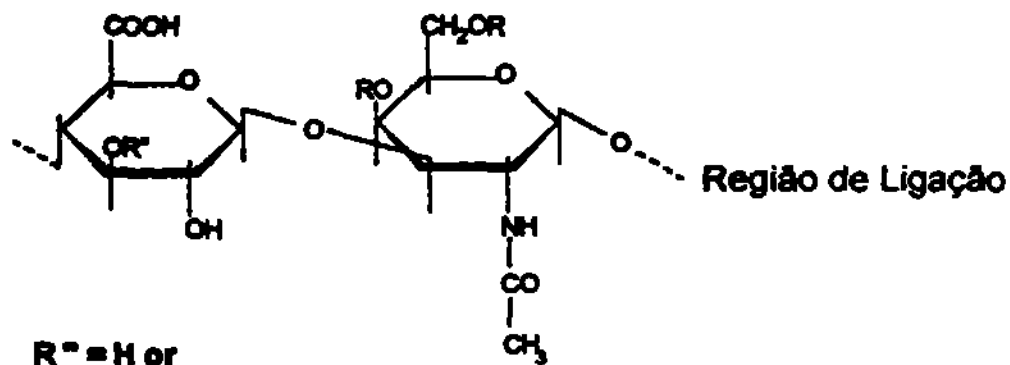
$R =$



Mais lábil à hidrólise ácida

- ~49%:  $R_1 = OSO_3^-$ ,  $R_2 = OH$ ,  $R_3 = OH$
- ~20%:  $R_1 = OSO_3^-$ ,  $R_2 = OH$ ,  $R_3 = OSO_3^-$
- ~17%:  $R_1 = OSO_3^-$ ,  $R_2 = OSO_3^-$ ,  $R_3 = OH$

Porção próxima ao terminal redutor



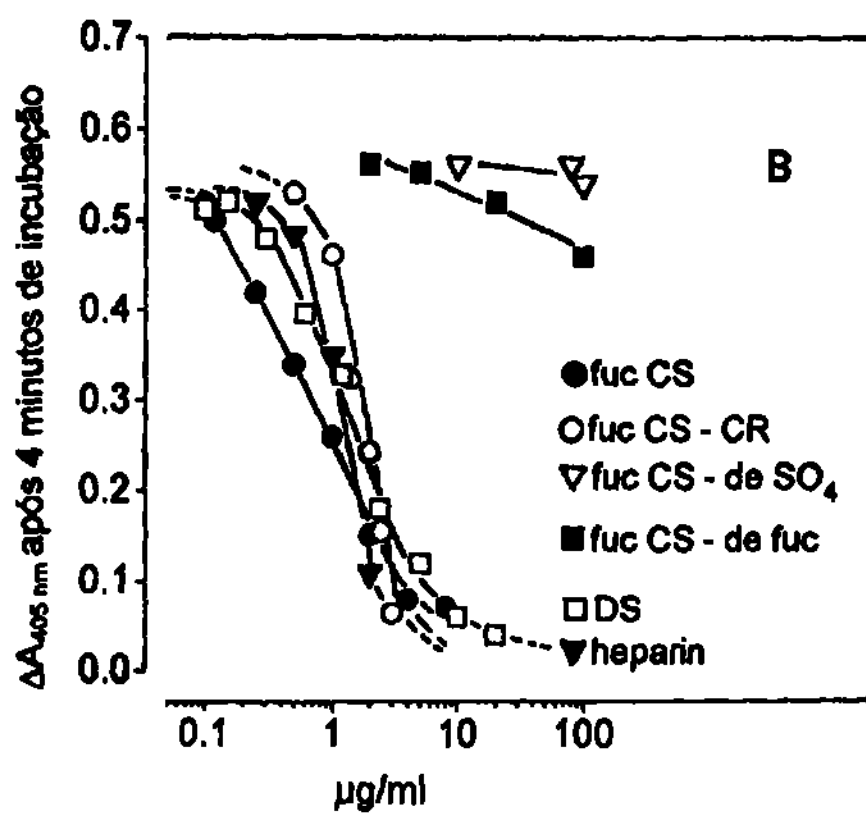
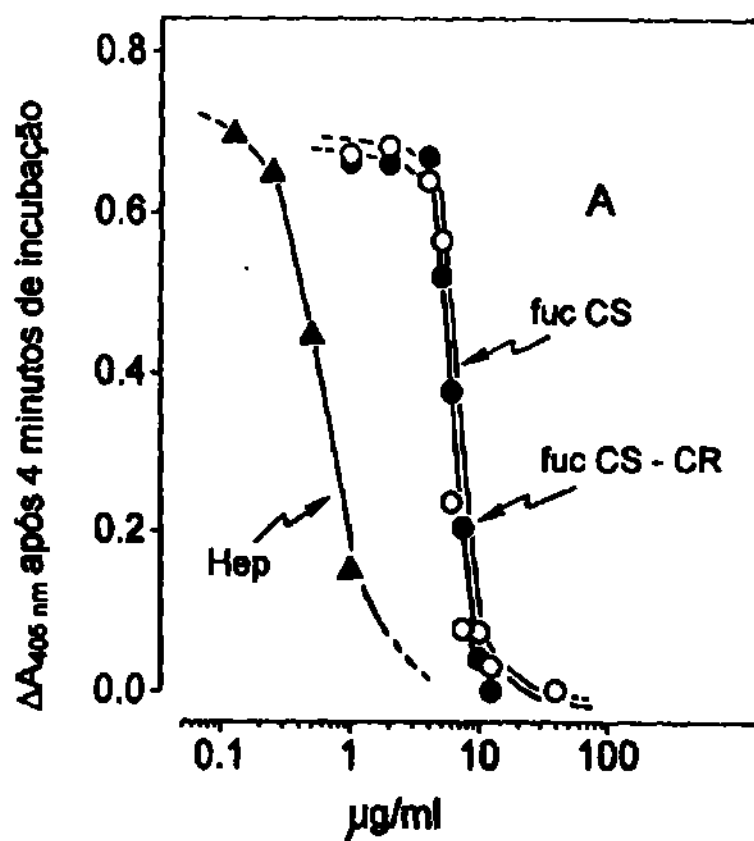
Mais resistente à hidrólise ácida

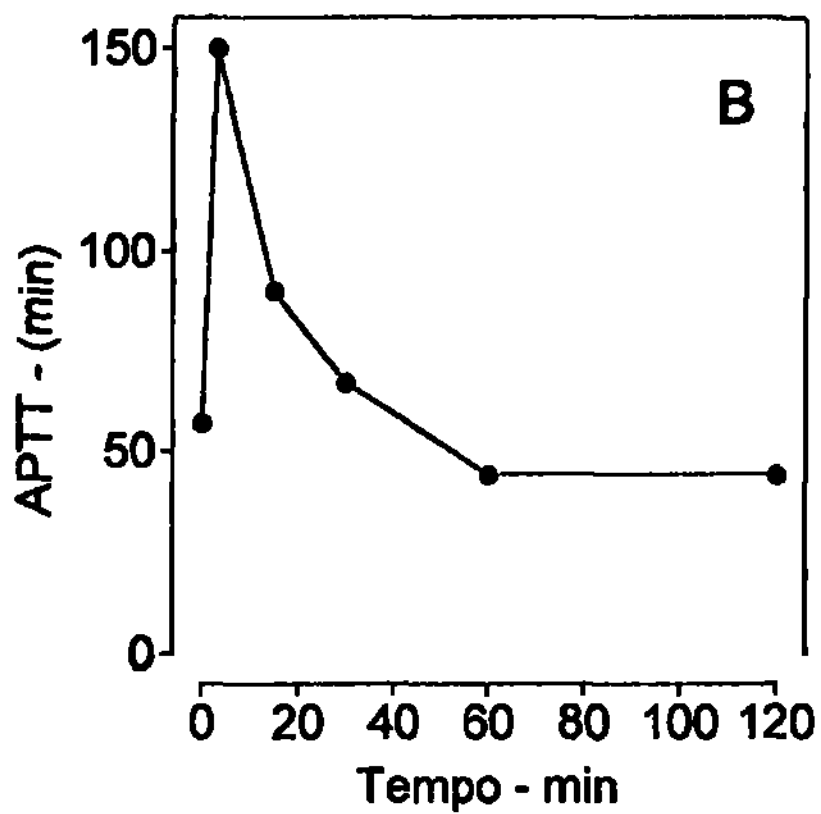
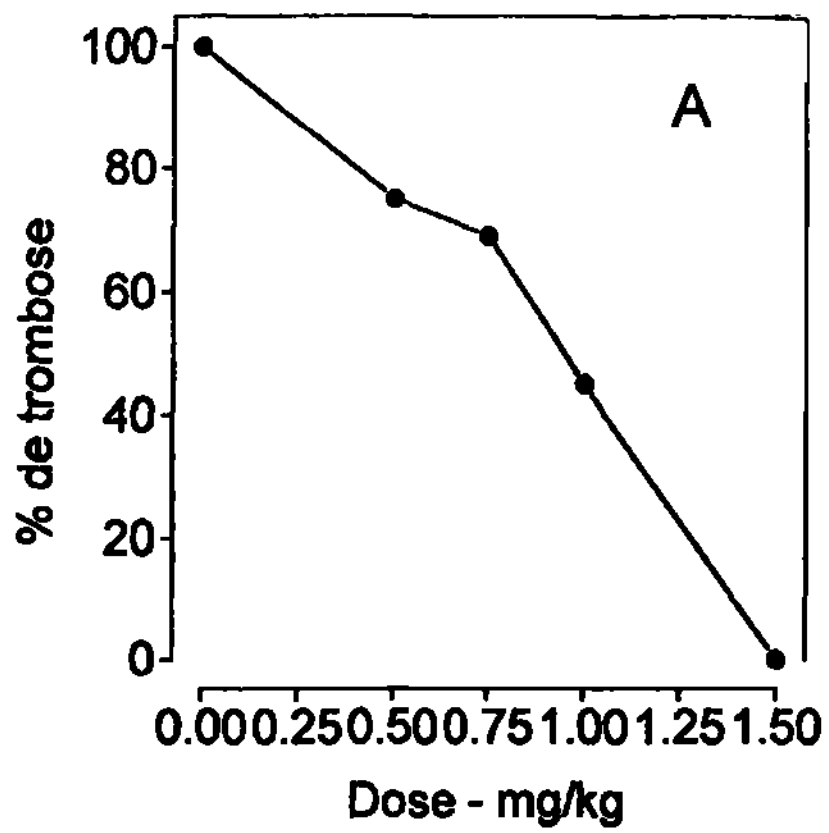
Unidades dissacarídicas de fucosil-fucosil

4-O-sulfatação?

Figura 1

960985  
3405





**Figura 3**



### **REIVINDICAÇÕES**

1. O MÉTODO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO de um "condroitim sulfato fucosilado" do invertebrado marinho pepino do mar.
2. A ESTRUTURA deste polissacarídeo sulfatado foi determinada por métodos químicos, enzimáticos e espectrofotométricos.
3. A DESCRIÇÃO DO EFEITO ANTICOAGULANTE deste "condroitim sulfato fucosilado", inclusive demonstrando que seu mecanismo deve-se a sua capacidade de potencializar a inibição da trombina pelo catador II da heparina e pela antitrombina.
4. A DESCRIÇÃO DO EFEITO ANTITROMBÓTICO do "condroitim sulfato fucosilado" e ausência de aparente efeitos tóxicos, indicando uma possível utilização deste composto na terapia e prevenção da trombose arterial.





## P R O C U R A Ç Ã O

Pelo presente instrumento particular de mandato, o INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, neste ato representado por sua Diretora HELENA MARIA SCOFANO, designada pela portaria no. 4.352 publicada no Boletim da UFRJ no. 51, de 23.12.93 e no Diário Oficial no. 11, de 17.01.94, anexa, nomeia e constitui sua bastante procuradora, NILZA XAVIER KOVER, brasileira, casada, advogada, inscrita na OAB/RJ sob o no. 49.671 e no CPF sob o no. 002.716.597-34, a quem confere poderes específicos para representar o outorgante junto ao INPI ou qualquer órgão da Administração Pública, para praticar todos os atos necessários referentes ao Depósito de Pedido de Privilégio "AÇÃO ANTICOAGULANTE E ANTITROMBOTICA DE UM CONDOITIM SULFATO FUCOSILADO EXTRAÍDO DO PEPINO DO MAR", até a expedição da Carta Patente.

Rio de Janeiro, 08 de agosto de 1996

*Helena Maria Scofano*  
HELENA MARIA SCOFANO

CARTÓRIO DO 10º OFÍCIO DE NOTAS - Av. Almirante Barroso, 139 - Lj. C. Gamir  
Rio de Janeiro - CEP 20031-005 - Tel.: (021) 240-1344 - Fax: (021) 240-5927  
Notário: José Augusto Proença Gomes - Substituto: Maria Lúcia de Freitas Frias  
Reconheço por semelhança a assinatura de HELENA MARIA SCOFANO  
Conferido por: Marco  
Valores 120896093452 Rio de Janeiro, 12 de Agosto de 1996  
Firmas UFERJ: 0,0401 Em testemunho da verdade  
P.Dados UFERJ: 0,0400  
Total UFERJ: 0,0440 José Dalmo Pereira Filho - E. Autorizado

10º Ofício  
OFÍCIO DE NOTAS  
J. DALMO PEREIRA F.  
AUTORIZADO  
CTPS - 124085 - RJ



### RESUMO

Patente de Invenção: "AÇÃO ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICA DE UM CONDROITIM SULFATO FUCOSILADO EXTRAÍDO DO PEPINO DO MAR".

- 5 A presente invenção se refere a descoberta de um "condroitim sulfato fucosilado" extraído do pepino do mar. Este polissacarídeo tem elevada atividade anticoagulante e antitrombótica, podendo ser utilizado na prevenção ou reversão da trombose arterial.